Journal of Horticultural Science
https:// jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 1, Spring 2022, p. 135-147

Effect of Drought Stress on Physiological and Phytochemical Traits of *Silybum marianum* L.

R. Ghanbari Moheb Seraj[1], M. Behnamian[2], A. Ahmadikhah[3*], V. Shariati[4], S. Dezhsetan[5]

Received: 17-03-2021 Revised: 06-07-2021 Accepted: 13-07-2021 Available Online: 20-06-2022	**How to cite this article:** Ghanbari Moheb Seraj R., Behnamian M., Ahmadikhah A., Shariati V., and Dezhsetan S. 2022. Effect of Drought Stress on Physiological and Phytochemical Traits of *Silybum marianum* L.. Journal of Horticultural Science 36(1): 135-147. (In Persian with English abstract) **DOI:** 10.22067/JHS.2021.68962.1022

Introduction

Plant growth and yield are affected often by stress conditions, especially drought, which is the most important factor in reducing crop production worldwide. *Silybum marianum* is an important pharmaceutical crop with great potential as a multipurpose plant for low-input cropping systems of the arid and semiarid regions.

Materials and Methods

In this experiment, the effect of drought stress (full irrigation at field capacity; no stress, irrigation at 70% of field capacity; mild stress and irrigation at 40% of field capacity; severe stress) on physiologic traits, the amount of silybin a and b and 1000 seed weight in milk thistle was studied in the research field of Shahid Beheshti University in 2017-2018. The experimental site is located in Shahid Beheshti University, Tehran, Iran (51.23°N, 35.48°E, and 1769 m above mean sea level). It has a moderate and mountainous climate with a mean annual rainfall of 145.2 mm and a mean temperature of 22ºC. This experiment was performed in a completely randomized block design with 3 replications. Milk thistle seeds were prepared from Isfahan Pakanbazr Company. The soil composition consisted of 1/3 clay, 1/3 sand, and 1/3 leaf composts. The field area was 150.0 m^2. Furrows were created to implement this study. The space of plants on rows was 0.5 m and between rows was 1 m. In general, 15 furrows were created and 15 plants were cultured on each furrow, so the total number of plants cultivated on the field was 225. Drought stress was applied at flowering stage. Soil moisture was measured by the weighing method. The soil samples were taken from various areas (randomly) of the field, three samples each day. After measuring the water content at F.C, based on that, the amount of 70%F.C and 40%F.C was also calculated. At the time of stress, F.C irrigation was performed every two days, 70% F.C irrigation every 4 days, and 40% F.C irrigation every 6 days. After 8 days, leaf sampling was performed to measure catalase, ascorbate peroxidase, proline and malondialdehyde content and seed sampling was performed to 1000 seed weight and extract analysis. For physiologic measurements, 3 plants were randomly assigned to each stack and their leaves were separated and transferred to the laboratory. Then, in the next step, their physiologic parameters (include Catalase and ascorbate peroxidase, proline and malondialdehyde content) were measured according to

1- Ph.D. of Biotechnology and Molecular Genetics, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(*- Corresponding Author Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir)

4- Assistant Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

5- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

the relevant protocol. In order to measure silybin, 4 plants were randomly considered to each stack and their seeds were harvested and combined and dried in shade condition in the laboratory for one month. The dried seed samples were completely powdered using a mill, then 10 g of the powders weighed and the oil extract of them was isolated by Soxhlet using n-hexane solvent. The extraction temperature was 70 °C and the extraction time was 6 h. After the extraction was completed, the extract was poured into dark glass. Next, the oil-free powder was dried in an incubator at 37 ° C. Methanol extract of oil-free powder was extracted using methanol solvent. For this purpose, 2 g of samples powder was weighed and 200 ml of 80% methanol was added to each of them and the mixture stirred for two days by Shaker. The mixture was then passed from a filter paper and after that, 200 ml of 80% methanol was added to the sample precipitate (on filter paper) and placed again on the shaker. After 24 h, extraction was performed by the same method and were added to the previous extract. The extracts were then concentrated in the environment temperature for two weeks. Concentrated extracts (powder) as well as standard silymarin with certain concentrations were dissolved in methanol solvent and used for injection into HPLC (Model: Infinity1260, Manufacturer: Agilent) using syringe filters with a diameter of 0.2 µm. After receiving the HPLC results, the data and peaks were analyzed and the amounts of silybin a and b were determined and compared at different levels of water stress. Statistical analysis of data was performed using R 3.6.1 and RStudio 1.1.463 software. Mean data were compared using Duncan's test with *agricolae* package at a significance level of 0.05.

Results and Discussion

The results showed that with increasing water stress intensity, the amount of silybin a and silybin b increased by 24% and 26%, respectively. The amount of these compounds in 40% were significantly higher than other treatments, so that its amount compared to F.C treatment (26.07 mg/g Grain DW in silybin a and 40.74 mg/g Grain DW in silybin b) and compared to the 70%F.C (25.32 mg/g Grain DW in silybin a and 34.64 mg/g Grain DW in silybin b) was higher. This indicates carbon assimilation from photosynthesis to produce secondary metabolites in this treatment. Also, the amount of silybin b compared to silybin a in all treatments was (0.8: 1.2), in which 1.2 is related to silybin b and 0.8 is related to silybin a. In severe stress treatment (40% of field capacity), the amount of silybin a and b (67.30 and 98.92 mg/g, respectively) increased significantly compared to other treatments. According to the mean comparison results, the highest activity of catalase (5.16 U/ml) and ascorbate peroxidase (2.26 U/ml) was observed in mild stress treatment. Proline content gradually increased with increasing stress intensity and reached its peak in severe stress (3.36 µM/gr). Lipid peroxidation also had their maximum in severe stress (8.35 nmol/grFW). The 1000 seeds weight was reduced by 6.8 g in severe stress treatment (40%F.C) compared to the control (F.C).

Conclusion

According to the results, the amount of milk thistle flavonoids can be increased for medicinal purposes including the treatment of liver disease and hepatitis by applying dehydration stress.

Keywords: Drought, HPLC, Methanol extract, Silymarin, Soxhlet

نشریه علوم باغبانی
https:// jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، ص ۱۴۷-۱۳۵

اثرتنش آبی بر صفات فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی گیاه دارویی خارمریم (*Silybum marianum* L.)

راحله قنبری محب سراج[۱]- مهدی بهنامیان[۲]- اسدالله احمدی خواه[۳]*- وحید شریعتی[٤]- سارا دژستان[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۲

چکیده

عوامل محیطی از یک طرف باعث تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و از طرف دیگر موجب تغییر در مقدار و کیفیت مواد موثره آن‌ها می‌گردند. در این آزمایش اثر تنش آبی (بدون تنش: آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی، تنش ملایم: آبیاری در حد ۷۰ ٪ ظرفیت زراعی، و تنش شدید: آبیاری در حد ۴۰ ٪ ظرفیت زراعی) بر صفات فیزیولوژیک، میزان سیلی‌بین a و b و وزن هزار دانه در گیاه دارویی خارمریم در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تنش آبی در مرحله گلدهی و به روش وزنی اعمال شد. نتایج حاصل نشان داد با افزایش شدت تنش آبی، مقدار سیلی‌بین a و b به ترتیب به میزان ۲۴ و ۲۶ درصد افزایش پیدا کرده است که مقدار این ترکیبات در تیمار آبیاری ۴۰ ٪ ظرفیت زراعی بطور قابل‌توجهی بالاتر از سایر تیمارها بود، بطوریکه مقدار آن نسبت به تیمار ظرفیت زراعی (به ترتیب، ۲۶/۰۷ و ۴۰/۷۴ میلی‌گرم در گرم وزن خشک دانه برای سیلی بین a و سیلی بین b) و نسبت به تیمار ۷۰ ٪ ظرفیت زراعی (به ترتیب، ۲۵/۳۲ و ۳۴/۶۴ میلی‌گرم در گرم وزن خشک دانه برای سیلی بین a و سیلی بین b) بیشتر بود. این امر حاکی از اختصاص بیشتر کربن تثبیت شده حاصل از فتوسنتز جهت تولید متابولیت‌های ثانویه در این تیمار بود. همچنین مقدار سیلی‌بین b نسبت به سیلی‌بین a در تمامی تیمارها به نسبت ۱/۲ (سیلی‌بین b) : ۰/۸ (سیلی‌بین a) بود. در تیمار ۴۰ ٪ ظرفیت زراعی مقدار سیلی‌بین a و b (به ترتیب ۶۷/۳۰ و ۹۸/۹۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بطور قابل‌توجهی نسبت به سایر تیمارها افزایش داشت. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز (۵/۱۶ واحد آنزیمی/میلی لیتر) و آسکوربات پراکسیداز (۲/۲۶ واحد آنزیمی/میلی لیتر) در تیمار تنش ملایم مشاهده شد. محتوای پرولین با افزایش شدت تنش به تدریج افزایش یافته و میزان آن در تنش شدید به حداکثر خود رسید (۳/۳۶ میکرومول بر گرم وزن تر). پراکسیداسیون لیپید در تنش شدید (۴۰ ٪ ظرفیت زراعی) بیشترین مقدار خود را داشت (۸/۳۵ نانومول/گرم وزن تر). وزن هزار دانه بذر نیز در تیمار تنش شدید (تیمار ۴۰ ٪ ظرفیت زراعی) نسبت به کنترل (تیمار ظرفیت زراعی) به میزان ۶/۸ گرم کاهش پیدا کرد. با توجه به نتایج آزمایش به نظر می‌رسد که می‌توان با اعمال شیوه کم آبیاری، میزان فلاونوئیدهای گیاه خارمریم را به منظور اهداف دارویی از جمله درمان بیماری‌های کبدی و انواع هپاتیت افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: خشکی، سوکسله، سیلی‌مارین، عصاره متانولی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۱- دکترای بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
۳- استادیار، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی
(*- نویسنده مسئول: Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir)
۴- استادیار ، گروه بیوتکنولوژی مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی
۵- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

DOI: 10.22067/JHS.2021.68962.1022

مقدمه

گیاه دارویی خارمریم (ماریتیغال) (*Silybum marianum* L.)، متعلق به تیره کاسنی، گیاهی یکساله یا دوساله است که در مناطق مدیترانه‌ای و در جلگه‌های هموار با آب و هوای گرم و در خاک‌های سبک شنی می‌روید و در مناطق گوناگونی از ایران نیز رویش دارد. ارتفاع ساقه این گیاه ۱۵۰ تا ۲۵۰ سانتی‌متر بوده و برگ‌های آن پهن و به حالت نیزه و دارای رگه‌های سفید می‌باشد. گل‌های آن نیز دارای کاپیتول‌های درشت منفرد و شامل گلبرگ‌های لوله‌ای به رنگ ارغوانی است (Mafakheri *et al.*, 2011). میوه این گیاه فندقه به رنگ قهوه‌ای براق یا خاکستری است و معمولاً به‌عنوان داروی گیاهی استفاده می‌شود (Guo *et al.*, 2018). فندقه‌های معمول این گیاه حدود ۰/۲ تا ۰/۶ درصد ترکیب سیلی‌مارین دارد (Hessini *et al.*, 2009). سیلی‌مارین، فلاونوئید اصلی (۷۰ درصد) یافت شده در گیاه خارمریم است، در حالی که ۳۰-۲۰ درصد فلاونوئید باقیمانده عمدتاً متشکل از ترکیبات پلی‌فنلی است (Turtola *et al.*, 2003). کمپلکس سیلی‌مارین معمولاً شامل ۳۶/۳ درصد سیلی‌بین، ۱۵/۷ درصد سیلی‌کریستین، ۵/۹ درصد سیلی‌دیانین و ۵/۱ درصد ایزوسیلی‌بین است (Selmar and Kleinwächter, 2013). سیلی‌مارین به‌طور گسترده‌ای برای درمان بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدچربی، آنتی‌پروکسیداتیو، ضدفیبروزی، ضدالتهابی، تنظیم سیستم ایمنی و بازسازی کبد است (Jaleel *et al.*, 2007). میوه گیاه دارای بیشترین مقدار سیلی‌مارین است، اما در برگ‌ها و بذرها نیز یافت می‌شود. سیلی‌بین، مهم‌ترین ماده زیستی و فعال سیلی‌مارین است (Rafiipour *et al.*, 2018) که برای درمان بیماری‌های کبدی و انواع هپاتیت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Boutraa *et al.*, 2010). سیلی‌بین بخش عمده سیلی‌مارین یعنی حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد آن را تشکیل می‌دهد (Vladimir and Daniela, 2005). سیلی‌بین دارای اثرات شبه استروژنی می‌باشد و ساختاری شبیه استروژن دارد که می‌تواند به گیرنده‌های استروژنی متصل شود و آن‌ها را فعال نماید (Kren and Walterova, 2005; Fatima et al., 2000).

عوامل محیطی از یک طرف باعث تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و از طرف دیگر موجب تغییر در مقدار و کیفیت مواد موثره آن‌ها می‌گردند. عملکرد یک گیاه دارویی وقتی مقرون به‌صرفه است که مقدار متابولیت‌های اولیه و ثانویه آن به حد مطلوب رسیده باشد. بنابراین با مدیریت عوامل محیطی می‌توان به حداکثر محصول دست یافت (Kummer *et al.*, 2001). تنش‌های زیستی و غیرزیستی تاثیر قابل‌توجهی بر تولید متابولیت‌های ثانویه متعدد در گیاهان دارند (Jalal et al., 2012). تنش خشکی همچنین به‌عنوان عامل افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در انواع گیاهان دارویی شناخته شده است (Carmen, 2007). درک پاسخ گیاه به خشکی، در تولید محصولات متحمل به تنش نقش اساسی دارد (Ram *et al.*, 2005; Yaghmaie *et al.*, 2010). حاجی‌آقایی و همکاران (Haji Aghaei *et al.*, 2018) نشان دادند که سطوح سیلی‌مارین و ترکیب‌های تشکیل دهنده آن به وسیله آب قابل دسترس متاثر شده است. هنداویو همکاران (Hasanloo *et al.*, 2007) در تحقیقات خود بیان کردند که با افزایش فواصل آبیاری، سیلی‌مارین کل و نیز اجزای تشکیل دهنده آن در گیاه خارمریم افزایش یافته است. افزایش در محتوای اسیدبتولینیک و ترکیبات فنلی تحت تنش کم آبی توسط آبرئو ومازافرا (Abreu and Mazzafera, 2005) در گل راعی[1] گزارش گردید. در برخی از گیاهان دارویی، تنش خشکی درصد تولیدات ثانویه را افزایش می‌دهد، زیرا در اثر تنش، به دلیل کاهش رشد، تثبیت کربن در طی فتوسنتز صرف تولید متابولیت‌های ثانویه شده وافزایش این مواد سبب جلوگیری از اکسیداسیون درون سلول‌ها می‌گردد (Salehi-Lisar and Bakhshayeshan-Agdam, 2016)، اما عملکرد متابولیت‌های ثانویه تحت تنش خشکی به دلیل کاهش بیوماس تولیدی کاهش می‌یابد (Hasanloo *et al.*, 2007). مقدار تجمع سیلی‌بین، ترکیب اصلی سیلی‌مارین در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران بسیار بالاتر از نمونه‌های کاشته شده در محیط گلخانه بود (Hammouda *et al.*, 1993). در تحقیقی دیگر روی گیاه ماریتیغال مشخص گردید که شرایط خاک، دما، نور و اقلیم مزرعه اثر چشمگیری بر رشد و عملکرد و همچنین مقدار ماده موثره گیاه ماریتیغال دارند (Stewart and Bewley, 1980). میزان فلاونوئیدهای ماریتیغال به شرایط اقلیمی که گیاه در آن رشد می‌کند، به ژنتیک جمعیت‌ها و نوع بذر آن بستگی فراوان دارد (Belitz, 2007). در این راستا، هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر سطوح مختلف تنش آبی بر برخی صفات فیزیولوژیک و همچنین محتوای سیلی‌بین a و b در گیاه دارویی خارمریم در شرایط مزرعه بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر تنش آبی بر صفات فیزیولوژیک، فیتوشیمیایی و همچنین وزن هزار دانه در گیاه دارویی خارمریم، آزمایشی در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در مزرعه دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ گیاه) بود. بذور گیاه دارویی خارمریم از شرکت پاکان‌بذر اصفهان تهیه شد. مزرعه با مساحت حدود ۱۵۰ متر و با

1- *Hypericum brasiliense*

بستر خاک رس، ماسه و خاکبرگ تهیه و سپس تعداد ۱۵ جوی و پشته به فاصله یک متر در آن ایجاد شد. نمونه‌برداری خاک از قسمت‌های مختلف مزرعه (۹ تکرار) در عمق نیم متری (متوسط گسترش ریشه در این گیاه تا عمق نیم متر می‌باشد) انجام شد و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در آزمایشگاه خاک بررسی شد و میانگین آن در جدول ۱ ارائه شد. بذور خارمریم با فاصله ۵۰ سانتی‌متر (با تراکم دو بوته در متر مربع) در قسمت داغاب پشته‌ها در عمق ۳ سانتی‌متر کشت و به فاصله هر ۳ روز بطور کامل آبیاری شد. پس از رشد گیاهان و رسیدن به مرحله گلدهی (زمانی که گل‌های ۵۰ درصد بوته‌ها باز شدند)، تنش آبی روی آن‌ها اعمال گردید.

جدول ۱- برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک قبل از اجرای آزمایش

Table 1- The physical and chemical properties of the soil before the experiment

عمق Depth (m)	بافت خاک Soil texture	پتاسیم K ($mg.kg^{-1}$)	فسفر P ($mg.kg^{-1}$)	درصد کربن آلی Organic carbon (%)	درصد کربنات کلسیم $CaCo_3$ (%)	اسیدیته خاک Soil asidity	قابلیت هدایت الکتریکی EC (mho/cm)	درصد اشباع Saturation (%)
0-50	لومی رسی Clay loam	189	8.8	0.72	22	8.7	0.36	48.2

تعیین میزان آب خاک

در مرحله اول میزان آب خاک به روش وزنی تعیین شد بدین صورت که ابتدا کل زمین بطور کامل و اشباع آبیاری گردید، پس از رسیدن خاک به حد ظرفیت‌زراعی (مقدار رطوبت خاک پس از خارج شدن آب ثقلی، عدم چسبندگی)، هر روز به میزان یک کیلوگرم خاک در سه تکرار از نقاط مختلف زمین برداشته و وزن شد، سپس خاک‌ها در آون با دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و در مرحله بعد وزن خشک آن‌ها نیز اندازه‌گیری و ثبت شد. زمانی که خاک در سطح ظرفیت زراعی بود میزان آب آن در سطح ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و سپس نمونه‌برداری از خاک تا زمانی که میزان آب آن به ۴۰ ٪ ظرفیت زراعی رسید انجام شد. برای محاسبه میزان آب موجود در خاک ابتدا وزن تر خاک اندازه‌گیری شد سپس وزن خشک خاک نیز اندازه‌گیری و از وزن تر خاک کسر گردید. این عمل به مدت ۸ روز انجام شد. در روز دوم خاک به ۱۰۰ ٪ ظرفیت زراعی رسید، در روز چهارم به ۷۰ ٪ ظرفیت زراعی و در روز هشتم به ۴۰ ٪ ظرفیت زراعی رسید (Boutraa *et al.*, 2010).

روش اعمال تنش آبی

به منظور اعمال تنش آبی، نمونه‌های گیاهی مربوط به تیمار ۱۰۰ ٪ ظرفیت زراعی (F.C) به صورت یک روز درمیان و به میزان ۲۵۰ لیتر (میزان آب تا پر شدن کامل جوی) آبیاری شد و نمونه‌های مربوط به ۷۰ ٪ ظرفیت زراعی (۷۰ درصد F.C) به فاصله هر چهار روز و به میزان ۱۷۵ لیتر و نمونه‌های مربوط به ۴۰ ٪ ظرفیت زراعی (۴۰ درصد F.C) به فاصله هر هشت روز و به میزان ۱۰۰ لیتر آبیاری شد. پس از گذشت ۸ روز، نمونه‌برداری برگ جهت اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، محتوای پرولین و مالون دی‌آلدهید و نمونه‌برداری بذر جهت استخراج عصاره انجام گرفت (Ahmadpour *et al.*, 2018; Rafiipour *et al.*, 2018).

وزن هزار دانه

به منظور بررسی وزن هزار دانه، در هر پشته ۳ گیاه در نظر گرفته شد و بذور آن ها جمع آوری و در پاکت‌های کاغذی قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس وزن هزار دانه برای هر گیاه اندازه گیری و محاسبه شد.

اندازه‌گیری‌های فیزیولوژیک

جهت اندازه‌گیری‌های فیزیولوژیک، ۳ بوته گیاه بطور تصادفی روی هر پشته در نظر گرفته شد و برگ‌های آن‌ها جدا شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس در مرحله بعد پارامترهای فیزیولوژیک آن‌ها طبق پروتکل مربوطه اندازه‌گیری شد.

آنزیم کاتالاز

میزان فعالیت کاتالاز با استفاده از روش پیشنهادی برگمیر (Bergmeyer *et al.*, 1983) محاسبه شد. جذب مخلوط در طول موج ۲۴۰ نانومتر و به مدت ۳ دقیقه خوانده شد و فعالیت آنزیم با استفاده از معادله زیر تعیین شد.

$$A = \frac{\Delta A_{240} \times df \times 1000 \times 2}{\varepsilon t}$$

A: فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومولار H_2O_2 تجزیه شده در یک دقیقه و در یک میلی‌لیتر عصاره پروتئینی.ΔA240: تفاضل جذب ۲۴۰ نانومتر در شروع و پایان واکنش. df: فاکتور رقت (df=50). عدد ۱۰۰۰: تبدیل میلی‌مولار به میکرومولار. عدد ۲: واکنش در کووت ۲ میلی‌لیتری انجام شده است. t: مدت زمان واکنش آنزیم. ε: ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن (۴۰ میلی‌مولار بر سانتی‌متر).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش ناکانو و آسادا (Mozaffarian, 2013) اندازه‌گیری شد. به میزان ۱ میلی‌لیتر محلول حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات، ۰/۵ میلی‌مولار H_2O_2 و ۱۰ میکرولیتر عصاره برگ تهیه شد. H_2O_2 در آخر برای شروع واکنش اضافه شد و کاهش جذب به مدت ۳ دقیقه در ۲۹۰ نانومتر ثبت شد. بلانک حاوی مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی می‌باشد. جهت تعیین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در هر میلی‌لیتر عصاره آنزیم از رابطه زیر استفاده شد (Mozaffarian, 2013):

$$A = \frac{\Delta A_{290} \times 0.5 \times V_1 \times df}{\varepsilon \times l \times t \times V_s}$$

$$\Delta A_{290} = A_{Start} - A_{End}$$

V1: حجم مخلوط واکنش (۱ میلی‌لیتر). df: فاکتور رقیق کننده. t: مدت زمان واکنش. Vs: حجم نمونه (۱۰ میلی‌لیتر). ε: ضریب خاموشی برابر ۲/۸ میلی مولار بر سانتی متر. فعالیت ویژه آنزیم آسکوربیت پراکسیداز به صورت تعداد میکرومول H_2O_2 تجزیه شده در هر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

محتوای پرولین

برای اندازه‌گیری محتوای پرولین از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد. جذب نوری محلول رویی واکنش از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از بلانک تولوئن خوانده شد و غلظت پرولین با استفاده از منحنی استاندارد تعیین و میزان آن براساس رابطه زیر در گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید.

$$Proline\ (\mu mole/groffreshweight) = \frac{proline(\mu g/ml) \times toluene\ (ml)}{115.5\ \mu g\ /\mu mole} / \frac{gsample}{5}$$

مالون دی آلدهید

میزان پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش استوارت و بولی (Stewart and Bewley, 1980) اندازه گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسیداسیون لیپیدها با استفاده از اختلاف بین طول موج‌های جذبی و ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر بدست آمد.

استخراج عصاره و اندازه‌گیری سیلی‌بین

به‌منظور استخراج عصاره، بذر بوته‌های مذکور برداشت شد و در فویل‌ها بطور آزادانه قرار گرفته و سپس به مکان سایه منتقل و به مدت یک ماه خشک گردید. نمونه‌های بذری خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب بطور کامل پودر گردیده و در زیپ کیف (کیسه‌های نایلونی) قرار گرفت. در مرحله بعد، ۱۰ گرم از پودر حاصل با استفاده از دستگاه سوکسله روغن‌گیری شد. بدین‌منظور نمونه‌ها به میزان ۱۰ گرم وزن شده و عصاره روغنی آن‌ها با استفاده از حلال هگزان استخراج گردید. دمای مورد استفاده برای عصاره‌گیری ۷۰ درجه و مدت زمان عصاره‌گیری ۶ ساعت بود. پس از پایان کار شیر سوکسله بسته شد تا هگزان موجود در عصاره بخار شود. سپس پودر روغن‌گیری شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Haji Aghaei *et al.*, 2018). در مرحله بعد عصاره نمونه‌ها با استفاده از حلال متانول استخراج گردید. بدین ترتیب ۲ گرم از پودر فاقد روغن نمونه‌ها وزن شده و به هر یک از آن‌ها ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت دو روز توسط شیکر هم زده شد و بعد نمونه‌ها با کاغذ صافی صاف شدند، به باقیمانده ۲۰۰ میلی‌لیتر دیگر متانول ۸۰ درصد اضافه شد و بر روی شیکر قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها با همان شرایط قبلی عصاره‌گیری شدند و به عصاره اولیه اضافه شدند. سپس عصاره‌ها در هوای آزاد به مدت دو هفته تغلیظ شدند (Salehi-Lisar and Bakhshayeshan-Agdam, 2016). عصاره‌های تغلیظ شده (پودری) و همچنین سیلی‌مارین استاندارد با غلظت‌های معین در حلال متانول حل شده و جهت تزریق به دستگاه HPLC (مدل: Infinity1260، سازنده: Agilent با آشکارساز UV/VIS، دتکتور Diod Array، پمپ L-7100 Merck Hitachi و نرم افزار EZ chrome) با استفاده از فیلترهای سرنگی با قطر ۰/۲ میکرومتر استفاده شدند. برای انجام عملیات آنالیز، ۲۰ میکرولیتر از محلول سیلی بین و عصاره نمونه‌های گیاهی به دستگاه تزریق شدند. پس از دریافت نتایج HPLC، داده‌ها و پیک‌های موردنظر در پژوهشکده گیاهان دارویی شهید بهشتی آنالیز شد. پس از آنالیز داده‌ها، مقادیر سیلی‌بین a و b تعیین و در سطوح مختلف تنش آبی مقایسه گردید. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R 3.6.1 و RStudio 1.1.463 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با پکیج *agricolae* در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد. برای رسم نمودارها و جداول از نرم افزارهای EXCEL 2013 و WORD 2013 استفاده شد.

نتایج

اندازه‌گیری پارامترهای فیزیولوژیک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین تیمارهای مختلف آبیاری از لحاظ پارامترهای وزن هزار دانه، کاتالاز، پرولین، مالون دی‌آلدهید، سیلی‌بین a و b تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ وجود داشت ولی از لحاظ پارامتر آسکوربات پراکسیداز تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ وجود داشت (جدول ۲).

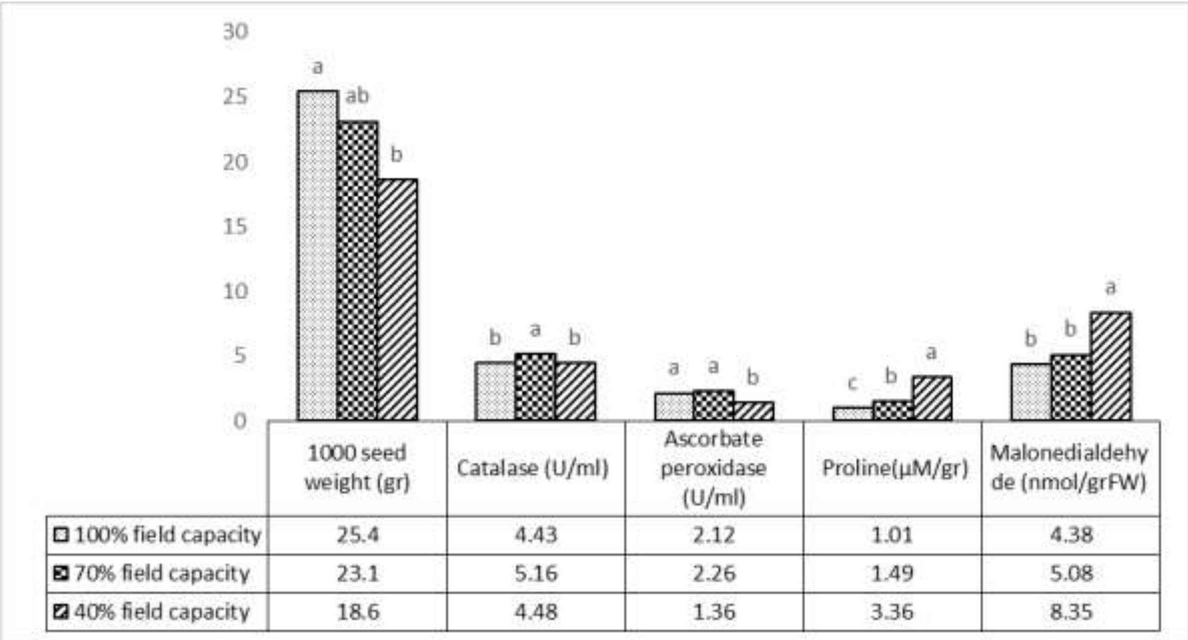
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس برخی از صفات اندازه‌گیری شده در گیاه دارویی خارمریم تحت تنش آبی
Table 2- ANOVA results or some measured traits in Milk thistle plant umder water stress

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degrees of freedom	وزن هزار دانه 1000 seed weight	کاتالاز Catalase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	پرولین Proline	مالون دی آلدهید Malonedialdehyde	سیلی بین a Silybin a	سیلی بین b Silybin b
بلوک Block	2	3.28	0.280	0.151	6.6	0.0016	7.7	5.4
تیمار Treatment	2	9.920**	2.920**	0.707*	320.5**	0.743**	66.7**	144.4**
خطا Error	4	2.12	0.0012	0.0711	6.5	0.007	0.007	0.002
ضریب تغییرات C.V (%)		5.32	0.68	9.01	7.44	1.08	0.16	0.06

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively.

با توجه به نتایج مقایسه میانگین، بیشترین وزن هزار دانه بذر (۲۵/۴ گرم) در تیمار ظرفیت زراعی و کمترین آن (۱۸/۶ گرم) در تیمار ۴۰ ٪ ظرفیت زراعی مشاهده شد. بالاترین فعالیت آنزیم کاتالاز (۵/۱۶ واحد آنزیمی بر میلی لیتر) و آسکوربات پراکسیداز (۲/۲۶ واحد آنزیمی بر میلی‌لیتر) در تیمار تنش ملایم مشاهده شد. اما در تیمار تنش آبی شدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاهش یافت (شکل ۲). محتوای پرولین با افزایش شدت تنش به تدریج افزایش یافته و میزان آن در تنش شدید به اوج خود رسید (۳/۳۶ میکرومول بر گرم) (شکل ۲). همانند محتوای پرولین، پراکسیداسیون لیپید (مالون دی‌آلدهید) نیز در تنش شدید حداکثر میزان خود را داشت (شکل ۱) (۸/۳۵ نانومول بر گرم وزن تر).

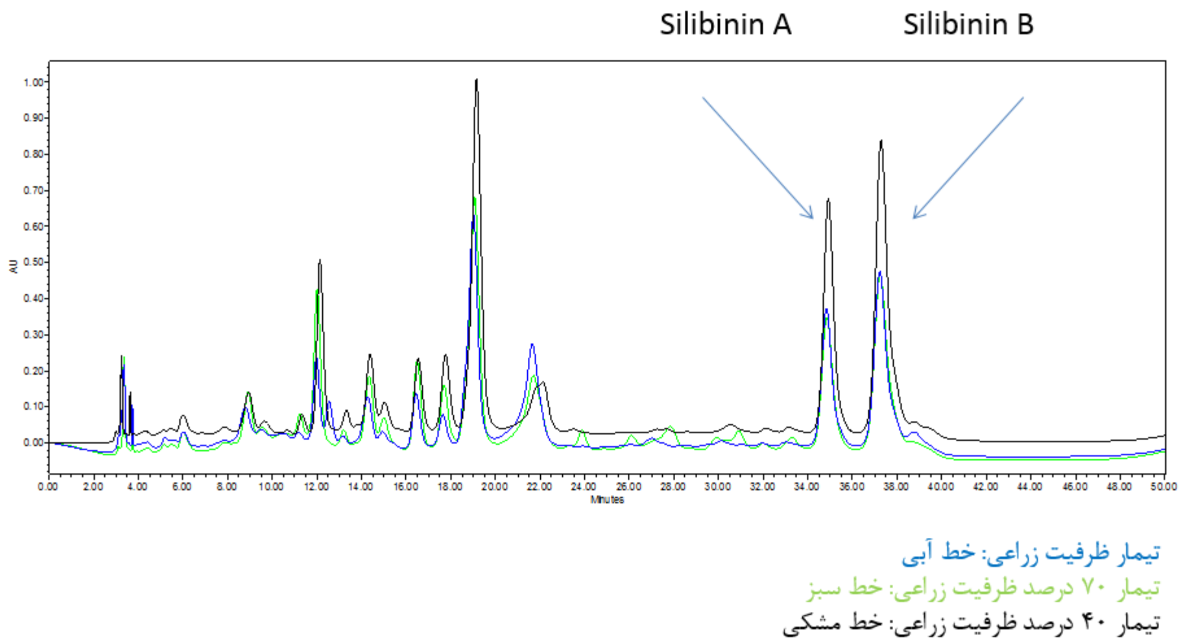


شکل ۱- تاثیر سطوح تنش آبی بر برخی صفات فیزیولوژیک و وزن هزار دانه در گیاه دارویی خارمریم
Figure 1- The effect of water stress levels on some physiological traits of Milk thistle (DMRT, $p\leq0.05$)

اندازه‌گیری سیلی‌بین

کروماتوگرام HPLC عصاره‌های متانولی بذر خارمریم

نتایج حاصل از تزریق عصاره متانولی به دستگاه HPLC بصورت کروماتوگرام دارای پیک‌های مختلف برای هر تیمار تنش آبی نمایش داده شد. روی هم‌گذاری کروماتوگرام سه تیمار تنشی مختلف حاکی از مقدار قابل‌توجه سیلی‌بین a و b در تیمار تنش شدید (آبیاری در حد ۴۰ ٪ ظرفیت‌زراعی) نسبت به سایر تیمارهای تنشی بود. با توجه به شکل ۲، تیمارهای بدون تنش (آبیاری در حد ظرفیت‌زراعی) و تنش ملایم (آبیاری در حد ۷۰ ٪ ظرفیت‌زراعی) تفاوت قابل‌توجهی از نظر مقدار سیلی‌بین a و b نداشتند.



شکل ۲- کروماتوگرام عصاره متانولی بذر خارمریم تحت تیمارهای مختلف تنش آبی

Figure 2- Chromatogram of methanolic extract of Milk thistle under different water stress levels

مقایسه مقادیر سیلی‌مارین در سطوح مختلف تنش آبی

به منظور تعیین کمیت سیلی‌بین a و b موجود در عصاره‌های گیاهی، مقادیر آن‌ها در معادلات رگرسیونی جایگزین و مقدار سیلی‌بین a و b برای آن‌ها محاسبه شد. مقادیر محاسبه شده برای تیمارهای مختلف تنش آبی در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج جدول ۳، با افزایش شدت تنش آبی، میزان سیلی‌بین a و b در عصاره افزایش یافت. در تیمار تنش شدید (۴۰ ٪ ظرفیت‌زراعی) مقدار سیلی‌بین a و b (به ترتیب ۶۷/۳۰ و ۹۸/۹۲ میلی‌گرم در گرم) بطور قابل‌توجهی نسبت به سایر تیمارها افزایش داشت (Aliabadi-Farahani *et al.*, 2009).

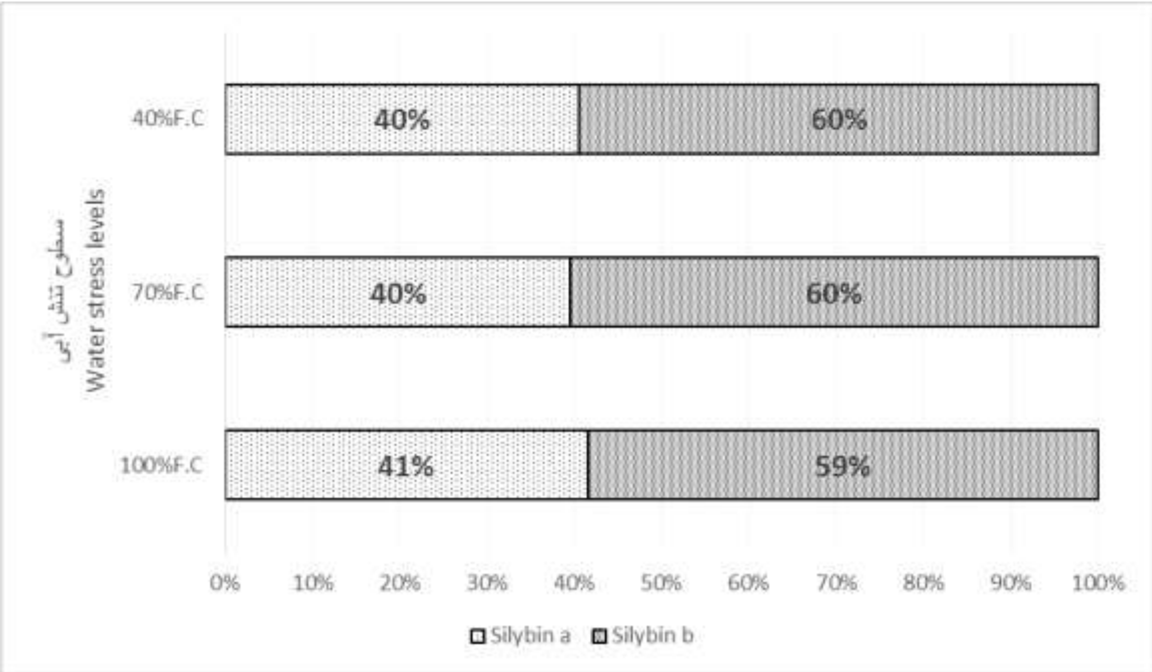
جدول ۳- مقادیر سیلی‌بین a و b محاسبه شده برای سطوح مختلف تنش آبی در گیاه خارمریم

Table 3- Silybin a and b values calculated for different levels of water stress in *S* Milk thistle

سطوح تیمار تنش آبی Water stress treatment levels	Silybin a(mg/g Grain DW[1])	Silybin b(mg/g Grain DW)
ظرفیت‌زراعی Field capacity	41.23[b]	58.18[c]
۷۰ ٪ ظرفیت‌زراعی 70% Field capacity	41.98[b]	64.28[b]
۴۰ ٪ ظرفیت‌زراعی 40% Field capacity	67.30[a]	98.92[a]

1- Dry weight

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است در تمامی تیمارهای تنش آبی، سیلی‌بین b درصد بیشتری نسبت به سیلی‌بین a به خود اختصاص داده است. از مجموع سیلی‌بین عصاره، ۶۰ درصد متعلق به سیلی‌بین b و ۴۰ درصد به سیلی‌بین a تعلق دارد. سیلی‌بین بخش عمده کمپلکس سیلی‌مارین یعنی حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد آن را تشکیل می‌دهد. سیلی‌بین ترکیبی از دو دیا-استرومر a و b می‌باشد که در شرایط طبیعی نسبت آن‌ها تقریبا ۱:۱ می‌باشد (Loguercio and Festi, 2011). نتایج بدست آمده حاکی از تفاوت اندک (۰/۸: ۱/۲) نسبت سیلی‌مارین a به b می‌باشد.



شکل ۳- مقادیر سیلی‌بین عصاره متانولی خارمریم در سطوح مختلف تنش آبی

Figure 3- Silybin levels of *S* Milk thistle methanolic extract at different levels of water stress

بحث

سیلی‌بین، مهم‌ترین ماده زیستی و فعال سیلی‌مارین است که بخش عمده آن یعنی حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد آن را تشکیل می‌دهد (Bijak, 2017). در تحقیق حاضر تاثیر تنش آبی بر میزان سیلی‌بین a و b و همچنین برخی صفات فیزیولوژیک و وزن هزار دانه در گیاه دارویی خارمریم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل حاکی از آن است که با افزایش شدت تنش آبی، گیاهان جهت مقابله با آن مکانیزم‌های متعددی از جمله تنظیم اسمزی و فعالیت آنزیمی بکار گرفتند. در آزمایش ما، در شرایط کم آبی شدید، پراکسیداسیون لیپیدی و از بین رفتن غشا به حداکثر خود رسیده است. مالون دی‌آلدهید محصولی از پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است (Hessini *et al.*, 2009). استرس آب می‌تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدها در غشاها از طریق تولید ROS[1] شود (Sairam *et al.*, 2000). در گیاه گرگ تیغ[2]، پرولین و MDA با افزایش شدت تنش افزایش یافته است (Guo *et al.*, 2018). مطالعات الساید و همکاران (ElSayed *et al.*, 2019) نشان داد ترکیب MDA با تنش کمبود آب افزایش یافت که این امر باعث سیالیت غشا به دلیل پراکسیداسیون لیپید تحت تنش خشکی می‌شود که در نتیجه باعث بهبود نفوذپذیری غشا می‌شود (Reddy *et al.*, 2004).

محتوای پرولین نیز به‌منظور تنظیم اسمزی با افزایش تنش آبی، افزایش پیدا کرده است. اسیدآمینه پرولین یکی از اسمولیت‌های اصلی در بیشتر گونه‌های گیاهی است که در شرایط تنش مختلف تجمع می‌یابد. در *Plectranthus tenuiflorus* با افزایش شدت تنش آب تا ۸۰ ٪ و ۶۰٪ ظرفیت زراعی، میزان پرولین در مقایسه با گیاهان شاهد (۱۰۰ ٪ ظرفیت زراعی) به طور معنی‌داری افزایش یافت (Jalal

1- Reactive oxygen species

2- *Lycium ruthenicum*

et al., 2012). نتایج السایـد و همکـاران (ElSayed *et al.*, 2019) نشان داد محتوای پرولین در برگ‌هـای گیـاه خـارمریم تحـت تـنش شدید خشکسالی در مقایسه با تنش ملایم به شـدت افـزایش یافـت. مطالعات متعدد گزارش کردند کـه تجمـع محتـوای پـرولین در ارقـام مقاوم به خشکی به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از ارقـام حسـاس بـه خشـکی زیتـون (Ben Ahmed *et al.*, 2009) ، تـوت (Reddy *et al.*, 2004) و گندم (Nayyar *et al.*, 2003) بـود. تجمـع اسـمولیت پرولین تحت تنش خشکی، اجازه تنظیم اسمزی در سیتوزول و واکوئل با محیط خارجی را می‌دهد و در نتیجه از سلول‌هـای گیـاه محافظـت می کند (Zhang *et al.*, 2017; Gadallah, 1999).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط کم آبی ملایم افزایش قابل‌توجهی نشان داده ولـی در شـرایط کم آبی شـدید فعالیـت آن‌هـا کـاهش یافتـه اسـت. کـاهش فعالیـت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت احتمالاً به دلیل تخریب و تجزیه آنزیم‌هـای مذکور به دلیل مواجه با کم‌آبی شدید باشد. بسیاری از آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از شرایط نامطلوب دارند، که از جمله آنها کاتالاز و آسکوربات پراکسـیداز (APX) اسـت. کاتالاز با توانایی جاروب رادیکـال H_2O_2 از تجمـع ROS جلـوگیری می‌کند و بنابراین گیاه را در برابر پراکسیداسیون لیپیدی سیسـتم‌هـای غشایی و آسیب‌هـای اکسـیداتیو تحـت اسـترس خشـکی محافظـت می‌نماید (Mafakheri *et al.*, 2011). آنـزیم APX نیـز بـه عنـوان آنزیم کلیدی برای کاتـالیز واکـنش H_2O_2 بـه H_2O عمـل مـی‌کنـد (Correa-Aragunde *et al.*, 2013). تحقیقـات السـاید و همکـاران (ElSayed *et al.*, 2019) نشان داد فعالیت کاتالاز در خارمریم تحت تنش خشکی بطور قابـل تـوجهی افـزایش پیـدا کـرده اسـت. آن‌هـا همچنین گزارش کردند تحت تنش خشکی فعالیت آنـزیم آسـکوربات پروکسیداز نیز به دلیل مهار و مصرف H_2O_2 و سایر ROS های تولید شـده افـزایش یافـت. افـزایش محتـوای پـرولین، همـراه بـا فعالیـت آنزیم‌های آنتی اکسیدان CAT، SOD، APX و POD نیز در مطالعه السـاید و همکـاران (ElSayed *et al.*, 2019) تشـخیص داده شـد. تجمع پرولین در سلول‌های گیاهی می‌تواند باعث ایجاد سیسـتم‌هـای دفاع آنتی اکسـیدانی شـود (Ben Ahmed, Türkan *et al.*, 2005; 2009) و همچنین ساختار و فعالیت آنـزیم‌هـا را ثابـت نگـه مـی‌دارد (Chaves *et al.*, 2003). بنابراین ممکن است کـه محتـوای بـالای پرولین در برگ‌های ماریتیغـال تحـت کمبـود شـدید آب در طـولانی مدت، باعث فعالیت‌های بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز شود.

تحت شرایط کم آبی، مقدار سیلی‌بین a و b نیز افزایش پیدا کرده است و مقدار این ترکیبات در تیمار آبیاری ۴۰ ٪ ظرفیت‌زراعی بطـور قابل توجهی بالاتر از سایر تیمارها بود که این امر بیانگر تثبیت کـربن حاصل از فتوسنتز جهت تولید متابولیت‌هـای ثانویـه در شـرایط تـنش شـدید مـی‌باشـد (Turtola *et al.*, 2003) و بیشـتر متابولیـت‌هـای تولیدی در گیاهان در شرایط تنش به‌منظور جلوگیری از اکسیداسـیون سلولی است. همچنین مقدار سیلی‌بین b نسـبت بـه سـیلی‌بـین a در تمامی تیمارها به نسبت (۱/۲ : ۰/۸) بود.

تحقیقات نشان داده که یکی از مهـم‌تـرین عوامـل تاثیرگـذار در میزان متابولیت‌های ثانویه موجـود در گیاهـان، تـنش‌هـای محیطـی اعمال شده بر آن‌ها می‌باشد. در حقیقت یکی از با اهمیت‌ترین وظایف متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نقش محافظتی آن‌ها در شرایط تـنش است. این ترکیبات به گیاهان کمـک مـی‌کننـد تـا بتواننـد در مقابـل شرایط نامساعد محیطی (مانند خشکی) مقاومت کنند و به حیات خـود ادامه دهند (Dehghani Bidgoli, 2018). کشاورز افشار و همکـاران (Keshavarz-Afshar *et al.*, 2015) گزارش کردند محتوای بیشـتر سیلیمارین در گیاهان تحت تنش ماریتیغال بیشتر مربوط به سـیلیبین، ایزوسیلیبین و سیلی کریستین انباشته شده در دانه‌ها نسبت داده شـده است و در شرایط خشکی محتـوای سـیلیدیانین کمتـر بـود. زاهیـر و همکاران (Zahir *et al.*, 2014) گزارش کردند تجمع محتوای فنل و فلاونوئید کل گیاهان خار مریم تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفـت. مستند شده است که تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان به شدت با شرایط رشد و تنش‌های محیطی ارتباط برقرار می‌کنـد (Falk *et al.*, 2007).

در گیاه ریحان و مریم گلی، تنش خشکی باعث افزایش محتـوای فنـل کـل و فلاونوئیـد کـل گردیـده اسـت (Ozkur *et al.*, 2009; Bettaieb *et al.*, 2011) که نتایج حاصـل بـا نتـایج تحقیـق حاضـر مطابقت داشت. همچنین محققین متعدد گزارش کرده‌اند که تنش آبی باعث افزایش اسانس در مرزه (Baher *et al.*, 2002)، آویشن دنـایی (Bahreininejad *et al.*, 2013)، آویشـن بـاغی (Eman *et al.*, 2008; Fabriki ourang and Davoudnia, 2018)، سنبل هنـدی (Fatima *et al.*, 2000) و پونه کوهی (Dunford and Vazquez, 2005) شده است. با توجه به نتـایج حاصـل از ایـن آزمـایش، تـنش خشکی منجر به فعال شدن مکانیسم دفـاعی گیـاه و بـه مـوازات آن افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه از جمله سـیلی‌بـین شـده اسـت کـه می‌تواند به دلیل نقـش محـافظتی آن‌هـا در شـرایط تـنش باشـد. در نهایت، تنش خشکی رشد گیاه و وزن هزار دانه را نیز تحت تاثیر قـرار می‌دهد. در آزمایش ما با افزایش شدت تـنش، وزن هـزار دانـه بطـور قابل توجهی کاهش پیدا کرده است. ابطحی و زینلـی (Abtahi and Zeynali, 2015) اثر سطوح مختلف تنش آبی، نیتروژن و تراکم بـذر بر عملکرد دانه گیاه ماریتیغال را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصـل از این تحقیق نشان داد که سطوح مختلف تـنش آبیـاری، نیتـروژن و تراکم، تأثیر بسیار معنی‌داری روی عملکرد دانه در متر مربع، عملکـرد دانه در هر بوته و شاخص برداشت دارد. حداکثر عملکرد دانه (۴۷۶/۷۵ گرم در متر مربع) مربوط به تنش ۵۰ میلی‌متر بود. بیشـترین عملکـرد دانه در هر بوته (۲۶/۳۵ گرم) در تنش آبیاری ۵۰ میلی‌متر حاصل شد.

حداقل میزان عملکرد دانه در متر مربع (۶۴/۴۷ گرم) در تنش آبیـاری ۱۵۰ میلی‌متر، کمترین عملکرد دانه در هر بوته (۶/۴۲ گرم) در تـنش آبیاری ۱۵۰ میلی‌متر به دست آمد.

منابع

1- Abreu IN., and Mazzafera P. 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. Plant Physiology and Biochemistry 43(3): 241-248. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.01.020.

2- Abtahi M., and Zeynali H. 2015. Effect of different levels of water stress, nitrogen and seed density on grain yield of Milk thistle (*Silybum marianum*). Journal of Plant Ecophysiology 7(21): 34-47.

3- Ahmadpour R., Armand N., Hosseinzadeh S., and Rigi G. 2018. The effect of compost fertilizer on some photosynthetic parameters in three growth stages of lentil (*Lens culinaris* Medik.) Under drought stress. Journal of Plant Research 31(4): 916-926.

4- Aliabadi-Farahani H., Valadabadi S.A., Daneshian J., and Khalvati M.A. 2009. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. Journal of Medicinal Plant Research 3: 329-333.

5- Baher Z.F., Mirza M., Ghorbanli M., and BagherRezaii M. 2002. The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L.. Flavour and Fragrance Journal 17(4): 275-277. https://doi.org/10.1002/ffj.1097.

6- Bahreininejad B., Razmjoo J., and Mirza M. 2013. Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*. International Journal of Plant Production 7(1): 155-166.

7- Bates L., Waldren R.P., and Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39: 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060.

8- Belitz A.R. 2007. Effects of environmental stress on growth, yield, and flavonolignan content in milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn). A Thesis Presented for the Masters of Science Degree. The University of Tennessee, Knoxville, USA.

9- Ben Ahmed C.H., Ben Rouina B., Sensoy S., Boukhris M., and Ben Abdallah F. 2009. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. Environmental and Experimental Botany 67: 345–352. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.07.006.

10- Bergmeyer H.U., Grasse M., and Walterh E. 1983. In: H.U. Bergmeyer (ed.), Methods of enzymatic analysis, 3rd ed 2:164.

11- Bettaieb I., Hamrouni-Sellami I., Bourgou S., Limam F., and Marzouk B. 2011. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L.. Acta Physiologiae Plantarum 33(4): 1103-1111. https://doi.org/10.1007/s11738-010-0638-z.

12- Bijak M. 2017. Flavonolignans Compounds not only for liver treatment. Pol Merkur Lekarski 42: 34–37.

13- Boutraa T., Akhkha A., Al-Shoaibi A., and Alhejeli A. 2010. Effect of water stress on growth and water use efficiency (WUE) of some wheat cultivars (*Triticum durum*) grown in Saudi Arabia. Journal Taibah University Science 3: 39-48. https://doi.org/10.1016/S1658-3655(12)60019-3.

14- Carmen T.M.D. 2007. Review of clinicaltrials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn). Integrative Cancer Therapies 6(2): 146-157.

15- Charles D.J., Simon J.E., Shock C.C., Feibert E.B.G., and Smith R.M. 1993. In: Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L. (Eds.): J. Janick and J.E. Simon. Proceedings of the second national symposium: New crops, exploration, research and commercialization. John Wiley and Sons Inc, New York, 640-643.

16- Chaves M.M., Maroco J.P., and Pereira J.S. 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. Functional Plant Biology 30: 239–264. https://doi.org/10.1071/FP02076.

17- Correa-Aragunde N., Foresi N., Delladonne M., and Lamattina L. 2013. Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by s-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern of Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 64: 3339-3349. https://doi.org/10.1093/jxb/ert172.

18- Dehghani Bidgoli R. 2018. Impact of drought and salinity stresses on some secondary metabolites of rosemary. Journal of Applied Research in Plant Ecophysiology 5(1): 37-51. (In Persian)

19- Dunford N.T., and Vazquez R.S. 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacol concentractions in Mexican oregano grown under controlled conditions. Journal of Applied Horticulture 7(1): 20-22.

20- ElSayed A.I., El-Hamahmy M., Rafudeen M.S., Mohamed A.H., and Omar A.A. 2019. The impact of drought

stress on antioxidant responses and accumulation of flavonolignans in Milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn). Plants (Basel, Switzerland) 8(12): 611. https://doi.org/10.3390/plants8120611.

21- Eman E., Aziz S.T., Hendawi E., Din A., and Omer E.A. 2008. Effect of soil type and irrigation intervals on plant growth, essential oil yield and constituents of *Thymus vulgaris* plant. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 4(4): 443-450 .

22- Fabriki ourang S., and Davoudnia B. 2018. Evaluation of growth characteristics and secondary metabolites in *Thymus vulgaris* under moderate salinity and drought stress. Ecophito Chemistry of Medicinal Plants 6(2): 27-39. (In Persian)

23- Falk K.L., Tokuhisa J.G., and Gershenzon J. 2007. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. Plant Biology 9: 573–581. https://doi.org/10.1055/s-2007-965431.

24- Fatima S., Farooqi A.H.A., Sharma S., Kumar S., Kukreja A.K., Dwivedi S., and Singh A.K. 2000. Effect of drought stress and plant density on growth and essential oil metabolism in *Citronella java* cultivars. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22(1): 563567.

25- Gadallah M. 1999. Effects of proline and glycinebetaine on Vicia faba responses to salt stress. Biologia Plantarum 42: 249–257. https://doi.org/10.1023/A:1002164719609.

26- Gebhardt R. 2002. Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis. Planta Medica 65: 289-90. https://doi.org/10.1055/s-2002-26761.

27- Guo Y.Y., Yu H.Y., Yang M.M., Kong D.S., and Zhang Y.J. 2018. Effect of drought stress on lipid peroxidation, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activity of leaves and roots of (*Lycium ruthenicum* Murr.) seedling. Russian Journal of Plant Physiology 65: 244–250. https://doi.org/10.1134/S1021443718020127.

28- Habán M., Otepka P., Kobida L., and Habánová M. 2009. Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion, Horticultural Science (Prague) 36(2): 25–30.

29- Haji Aghaei R., Reza Zadeh Sh., Ghafarzadegan R., Mohammadnejad A., and Tavakoli M. 2018. On the effect of solvent consumption, input feed and the method of oiling in three standardized silymarines. Journal of Medicinal Plants 17(2): 167-176.

30- Hammouda F.M., Ismail S.I., Hassan N.M., Zaki A.K., and Kamel A. 1993. Evaluation of the silymarin content in *Silybum marianum* Gaertn. Cultivated under different agriculture conditions. Phytotherapy Research 7: 90-91.

31- Hasanloo T., KhavariNejad R., and Majidi Harvan A. 2007. Investigation of morphological traits and types of flavonolignans in cultivated milk thistle and native of Iran. Journal of Medical Plants 6(22): 77-90. (In Persian)

32- Hendawy S.F., Hussein M.S., Youssef A.A., and EL-Mergawi R.A. 2013. Respnse of *Silybum marianum* plant to irrigation intervals combined with fertilization, Nusant Ara Bioscience 5: 22-29. https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n050104.

33- Hessini D.M., Delong JM., Gandour M., Albouchi A., Soltani A., and Abdelly C. 2009. Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water use efficiency in *Spartina alterniflora*. Environmental and Experimental Botany 67: 312–319. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.010.

34- Indrák P., and Chytilová D. 1992. K problematice stanovení silybinu v droze ostropestřece mariánského. Zahradnictví 22: 309–313.

35- Jalal R.S., Moftah A.E., and Bafeel S.O. 2012. Effect of salicylic acid on soluble sugars, proline and protein patterns of shara (*Plectranthus tenuiflorus*) plants grown under water stress conditions. International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science 2: 400-407.

36- Jaleel C.A., Manivannan P., and Sankar B. 2007. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. Colloids Surf. B: Biointerfaces 60: 110-116.

37- Keshavarz-Afshar R., Chaichi M.R., Ansari-Jovini M., Jahanzad E., and Hashemi M. 2015. Accumulation of silymarin in milk thistle seeds under drought stress, Planta 242(3): 539-43. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.006.

38- Kren V., and Walterova D. 2005. Silybin and silymarin-new effects and applications. Biomedical Papers 149: 29–41. https://doi.org/10.5507/bp.2005.002.

39- Kummer V., Maskova J., Canderle J., and Zraly Z. 2001. Estrogenic effects of silymarin in ovariectomized rats. VetMed-Czech 46: 17-23.

40- Kusano T., Berberich T., Tateda C., and Takahashi Y. 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. Planta 228: 367-381. https://doi.org/10.1007/s00425-008-0772-7.

41- Loguercio C., and Festi D. 2011. Silybin and the liver: From basic research to clinical practice. World Journal Gastroenterol 17(18): 2288–2301.

42- Mafakheri A., Siosemardeh A., Bahramnejad B., Struik PC., and Sohrabi Y. 2011. Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. Australian Journal of Crop Science 5(10): 1255-1260.

43- Mozaffarian V. 2013. Identification of medicinal and aromatic plants of Iran, Tehran: Farhang Moaser Publishers.
44- Nakano Y., and Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol 22: 867-880. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
45- Nayyar H. 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. Environmental and Experimental Botany 50: 253–264. https://doi.org/10.1016/S0098-8472(03)00038-8.
46- Ozkur O., Ozdemir F., Bor M., and Turkan I. 2009. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte Capparisovata to drought. Environmental and Experimental Botany 66(3): 487-492.
47- Rafiipour M., Gholami M., and Sarikhani H. 2018. The effect of low irrigation on some morphological and physiological characteristics of three strawberry cultivars. Journal of Plant Research 31(4): 806-817.
48- Ram G., Bhan M.K., Gupta K.K., Thaker B., Jamwal U., and Pal S. 2005. Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* (L.) Gaertn, Fitoterapia 76: 143-147.
49- Reddy A.R., Chaitanya K.V., and Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plant. Journal of Plant Physiology 161: 1189-1202. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013.
50- Reddy A.R., Chaitanya K., Jutur P., and Sumithra K. 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. Environmental and Experimental Botany 52: 33–42. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.01.002.
51- Sairam R.K., Srivastava G.C., and Saxena D.C. 2000. Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. Biologia Plantarum 43: 245–251. https://doi.org/10.1023/A:1002756311146.
52- Salehi-Lisar S.Y., and Bakhshayeshan-Agdam H. 2016. Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In: Hossain, M.A., Wani, S., Burritt, D.J., Tran, L.S.P. (Eds.). Drought Stress Tolerance in Plants 1: 1–16.
53- Selmar D., and Kleinwächter M. 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. Industrial Crops and Products 42: 558-566. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.020.
54- Šeršeň F., Vencel T., and Annus J. 2006. Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. Fitoterapia 77: 525–529. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.06.005.
55- Stewart R.R., and Bewley J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiology 65: 245–248. https://doi.org/10.1104/pp.65.2.245.
56- Tahernia M.S., Isfahani M., Baksh D., and Rabi B. 2013. The effect of planting date and plant density on phyllochron and active ingredient of Milk Thistle. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research 29 (4): 841-828.
57- Türkan I., Bor M., Özdemir F., and Koca H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science 168: 223–231.
58- Turtola S., Manninen A., Rikala R., and Kainulainen P. 2003. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in scots pine and norway spruce seedling. Journal of Chemical Ecology 29: 1981-1995. https://doi.org/10.1023/a:1025674116183.
59- Vladimir K., and Daniela W. 2005. Silybin and silymarin - new effects and application. Biomedical Papers 149(1): 29-41.
60- Yaghmaie P., Uryan Sh., Solati J., Mohammadi Kh., and Salari A. 2010. Investigation on Anxiolytic Effects of Silymarin Derived from Milk thistle in rat. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 15: 43-51. (In Persian)
61- Zahir A., Abbasi B.H., Adil M., Anjum S., Zia M., and Ul-Haq I. 2014. Synergistic effects of drought stress and photoperiods on phenology and secondary metabolism of *Silybum marianum*. Biotechnology and Applied Biochemistry 174: 693–707. https://doi.org/10.1007/s12010-014-1098-5.
62- Zhang W., Xie Z., Wang L., Li M., Lang D., and Zhang X. 2017. Silicon alleviates salt and drought stress of Glycyrrhiza uralensis seedling by altering antioxidant metabolism and osmotic adjustment. Journal of Plant Research 130:611–624. https://doi.org/10.1007/s10265-017-0927-3.
63- Zhao C.X., Guo L.Y., Jaleel C.A., Shao H.B., and Yang H.B. 2008. Prospects for dissecting plant-adaptive molecular mechanisms to improve wheat cultivars in drought environments. Comptes Rendus Biologies 331: 579–586. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.040058.x.